

PENGARUH KONSENTRASI SUBSTRAT DAN LAMA INKUBASI TERHADAP PRODUKSI ENZIM SELULASE DARI *TRICHODERMA REESEI* PADA MEDIA SABUT KELAPA

Jasman^{1,*}), Elda Limau², Yosep Lawa³
Program Studi Pendidikan Kimia, FKIP, Universitas Nusa Cendana
e-mail korespondensi: j.undana.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi substrat dan lama inkubasi yang terbaik, serta untuk mengetahui ada tidaknya interaksi pengaruh konsentrasi substrat dan lama inkubasi dari *T.reesei* pada media sabut kelapa. Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yaitu persiapan sampel, perlakuan kimia (basa), peremajaan jamur *T.reesei*, produksi ekstrak kasar enzim selulase, pemanenan enzim, dan uji aktivitas enzim selulase menggunakan metode DNS. Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan faktorial yang terdiri dari dua faktor yaitu konsentrasi substrat dan lama inkubasi, dengan pengulangan sebanyak dua kali. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA dua arah dengan taraf signifikan 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi konsentrasi substrat dan lama inkubasi memberikan pengaruh terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan dan interaksi antara konsentrasi substrat dan lama inkubasi tidak memberikan pengaruh terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan. Data menunjukkan bahwa lama inkubasi terbaik adalah 5 hari sedangkan konsentrasi substrat terbaik belum tercapai karena rentang konsentrasi yang digunakan belum mencapai konsentrasi maksimum.

Kata kunci : sabut kelapa, enzim selulase, aktivitas enzim

ABSTRACT

*This research aims to determine the best substrate concentration and incubation time, as well as to determine whether there is an interaction between the effect of substrate concentration and incubation time of *T.reesei* on coconut coir media. This research was carried out in several stages, namely sample preparation, chemical (alkaline) treatment, rejuvenation of *T.reesei* mushrooms, production of crude extract of cellulase enzymes, harvesting enzymes, and testing cellulase enzyme activity using the DNS method. The experimental design used in this research was a factorial design consisting of two factors, namely substrate concentration and incubation time, with two repetitions. The data obtained were analyzed using two-way ANOVA with a significance level of 5%. The results of the research showed that variations in substrate concentration and the interaction between substrate concentration and incubation time has no influences on the activity of the cellulase enzyme produced. The data shows that the best incubation time is 5 days, while the best substrate concentration has not been achieved because the concentration range used has not reached the maximum concentration.*

Keyword: coconut fiber, cellulase enzyme, enzyme activity

PENDAHULUAN

Salah satu komoditi yang memiliki nilai jual yang penting bagi petani di Indonesia adalah buah kelapa. Data tahun 2019 menunjukkan, Indonesia memiliki luas areal kelapa 3.500.726 (ha) dan menghasilkan produksi sebanyak 2.992.190 (ton) (Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, 2020). Kelapa juga merupakan komoditas merakyat karena hampir semua masyarakat membutuhkan komoditas tersebut (Widiyanti, 2015). Salah satu hasil dari produksi kelapa adalah sabut kelapa. Sabut merupakan bagian mesokarp (selimut) yang berupa serat-serat kasar kelapa. Biasanya sabut disebut sebagai limbah yang hanya ditumpuk dibawah tegakan tanaman kelapa lalu dibiarkan membusuk atau kering dan pemanfaatannya paling banyak hanyalah untuk bahan bakar.

Sabut kelapa terdiri dari hemiselulosa 18,99%, selulosa 22,35 %, dan lignin 43,11 % (Sitompul, 2017). Lignin terdapat pada jaringan tanaman yang terikat pada selulosa dan komponen tanaman lainnya tepatnya di dalam jaringan vaskuler yang khusus untuk pengangkutan cairan dan kekuatan mekanik. Lignin tersusun atas fenilpropana sebagai monomernya (Sjostrom, 1981), sedangkan unit dasar pembentuk lignin adalah aromatik propenil alkohol (monolignol). Hemiselulosa merupakan polisakarida yang mempunyai berat molekul lebih kecil daripada selulosa. Berbeda dengan selulosa yang hanya tersusun atas glukosa, hemiselulosa tersusun dari bermacam-macam jenis gula, yaitu glukosa, mannanosa, dan galaktosa (heksosan) serta xilosa dan arabinosa (pentosan) (Wiratmaja *et al.*, 2011). Selulosa adalah komponen penyusun utama pada dinding sel bahan lignoselulosa. Pada dinding sel tumbuhan tingkat tinggi memiliki kandungan selulosa sebesar 35-50% (Lynd *et al.*, 2002). Salah satu jenis jamur yang dapat mendegradasi selulosa adalah *Trichoderma reesei*.

T.reesei merupakan jamur berfilamen yang bersifat mesofilik, tidak patogen, mempunyai kemampuan menghidrolisis selulosa dan hemiselulosa menjadi glukosa dan xylosa, dan banyak digunakan untuk memproduksi enzim selulase dengan biaya murah. *T.reesei* menghasilkan endoglukanase dan eksoglukanase sampai 80 % tetapi β -glukosidasenya lebih rendah sehingga produk utama hidrolisisnya bukan glukosa melainkan selobiosa (Ahmed dan Vermette, 2008; Martins *et al.*, 2008) yang merupakan inhibitor kuat terhadap endoglukanase dan eksoglukanase. *T.reesei* adalah kapang yang paling banyak diteliti karena mampu mensekresikan selulase sekitar 80 %.

Selulase adalah suatu enzim yang mampu menguraikan selulosa dengan cara menghidrolisis ikatan β -1,4 glikosidik menjadi bentuk yang lebih sederhana yaitu monomer glukosa (Lehninger, 1988). Penguraian selulosa oleh enzim selulase memiliki peranan yang penting karena banyak limbah pertanian yang mengandung selulosa (komponen utama dinding sel tanaman) (Meryandini *et al.*, 2009), sehingga limbah dapat diubah menjadi produk glukosa, yang kemudian dapat menjadi bahan baku untuk produksi alkohol. Selulase dapat disintesis oleh jamur, bakteri dan tanaman, dengan fokus penelitian terbanyak adalah produksi selulase pada bakteri dan jamur, baik aerobik maupun anaerobik. Enzim selulase banyak digunakan pada industri detergen, makanan ternak, tekstil, pabrik kertas dan dalam bahan berserat selulosa. Untuk mendapatkan enzim selulase yang dapat menghidrolisis selulosa secara optimal, maka dilakukan produksi enzim selulase yang dimodifikasi (Melati *et al.*, 2014). Produksi enzim oleh sabut kelapa ini sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor di antaranya lama inkubasi dan konsentrasi substrat. Pengaruh lama inkubasi terhadap produksi enzim yaitu lama inkubasi berkaitan erat dengan produksi enzim dan metabolisme lainnya hingga batas tertentu. Inkubasi dalam waktu yang terlalu lama menyebabkan penipisan nutrisi sehingga menekan kondisi fisiologis fungi yang berdampak pada menurunnya produksi enzim (Gautam *et al.*, 2011). Produksi selulase pada fungi *Thielaviopsis basicola* (MTCC1467) mengalami peningkatan pada tahap awal fermentasi, yaitu pada hari ke-1 sampai ke-3 dan selanjutnya mengalami penurunan (Gologuri *et al.*, 2015). Penurunan aktivitas enzim juga erat kaitannya dengan suhu, karena kapang *T.reesei* tidak tahan terhadap panas (Gautam *et al.*, 2011); (Kodri *et al.*, 2013).

Pengaruh konsentrasi substrat terhadap produksi enzim yaitu produksi enzim terbaik didapatkan pada substrat dan mikroorganisme yang jumlahnya sama banyak. Substrat yang terlalu sedikit, tidak dapat mencukupi nutrisi untuk dapat hidup dengan optimal. Nutrien yang ditambahkan ke dalam media fermentasi akan dihabiskan selama berlangsungnya proses fermentasi sampai dihasilkan aktivitas enzim yang maksimal, kemudian berkurangnya nutrien akan mengakibatkan aktivitas produksi enzim dan pertumbuhan mikroorganisme akan menurun (Suhartono, 1989). Substrat yang terlalu banyak dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Substrat yang berlebih juga akan dapat menyebabkan racun bagi mikroorganisme, sehingga pertumbuhan mikroorganisme terhambat dan terjadi substrat inhibisi yang akan menjadi racun bagi pertumbuhan mikroorganisme.

Penelitian sebelumnya belum melakukan penelitian Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Lama Inkubasi terhadap Produksi Enzim Selulase. Oleh karena itu, akan dilakukan suatu kajian untuk

mengetahui Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Lama Inkubasi terhadap Pembentukan Enzim Selulase dari *Trichoderma reesei* pada Media Sabut Kelapa.

METODE

Alat dan Bahan Penelitian

a. Alat Penelitian

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pisau, blender, toples kaca, tabung reaksi, gelas kimia, kertas saring whatman, *magnetic stirrer*, bunsen, kawat ose, spektrofotometer UV-Vis, lemari pendingin, inkubator, sentrifuge, *laminar air flow*, neraca analitik, *autoclave*, *hot plate*, oven, pipet tetes, botol kimia 100 mL dan peralatan gelas (gelas kimia dan erlenmeyer).

b. Bahan Penelitian

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sabut kelapa, *aquadest*, *Trichoderma reesei*, *yeast extract*, H_2SO_4 , KH_2PO_4 , NaOH, $(NH_4)_2SO_4$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, PDA, larutan CMC (*carboxy methyl cellulose*) 1%, reagen DNS (*dinitro salisilic acid*), Na-K tartrat, Na- metabisulfit, buffer sitrat, *bacteriological peptone*, glukosa p.a, fenol.

Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri dari 2 faktor yaitu waktu dengan variasi (3, 5, dan 7 hari) dan konsentrasi substrat dengan variasi (10; 15; 20; 25% m/v). Desain tersebut dibuat dalam bentuk tabel seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Desain Penelitian

Waktu (a)	Konsentrasi Substrat (% m/v) (b)			
	10%	15%	20%	25%
3 hari	a1b1	a1b2	a1b3	a1b4
5 hari	a2b1	a2b2	a2b3	a2b4
7 hari	a3b1	a3b2	a3b3	a3b4

Prosedur Penelitian

a. Pre-treatment Bahan Baku

1. Persiapan Sampel

Sabut kelapa dibersihkan, kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari selama 2-3 hari setelah itu dipotong-potong hingga ukurannya kecil.

2. Perlakuan Kimia (Basa)

Potongan sabut kelapa diblender untuk memperkecil ukurannya diayak untuk memperoleh ukuran yang sama yaitu 100 mesh. Direndam dengan NaOH 6% perbandingan 1:10 selama 12 jam disaring dan dicuci berulang kali hingga pH netral setelah itu dikeringkan dengan menggunakan oven.

b. Persiapan Jamur *T.reesei*

1. Peremajaan

Jamur diambil dengan menggunakan kawat ose yang telah dipijarkan dengan api dengan cara dikerik. Lalu jamur yang telah diambil dengan ose tersebut ditanam dengan cara menggores secara zig-zag pada permukaan media PDA. Jamur diinkubasi pada suhu 37 °C selama 7 hari. Selama pengerjaan dilakukan di *Laminar Air Flow* dalam kondisi aseptis.

2. Penyiapan Inokulum

Larutan nutrisi dibuat dengan mencampurkan larutan buffer sitrat pH 3,5 dengan 1,0 g ekstrak ragi (*yeast extract*); 1,5 g *bacteriological pepton*; 1,4 g $(NH_4)_2SO_4$; 2,0 g KH_2PO_4 ; 0,005 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ dan 5

mL larutan CMC 1%. Dilarutkan ke dalam 100 mL *aquadest*. Larutan kemudian diaduk hingga homogen. Dimasukkan ke dalam *autoclave* untuk disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah dingin, ke dalam larutan nutrisi dimasukkan satu jarum ose isolat *T.reesei* kemudian diinkubasi selama tujuh hari.

Produksi Enzim Selulase

a. Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase

Produksi enzim selulase dimulai dengan dicampurkan substrat sabut kelapa dengan variasi konsentrasi 10, 15, 20, dan 25 gr bubuk sabut kelapa dengan 125 mL larutan nutrisi ke dalam erlenmeyer 250 mL kemudian ditutup dengan kapas steril dan dilapisi aluminium foil, kertas, dan diikat dengan benang. Campuran substrat dan media kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* pada temperatur 121°C selama 15 menit. Media kemudian didinginkan hingga suhu ruang sebelum proses inokulasi mikroba secara aseptik dilakukan. Spora yang tumbuh di dalam satu tabung reaksi disuspensikan ke dalam 1 mL larutan 0,1% tween 80 kemudian diinokulasikan secara aseptik ke dalam media. Hasil dari proses tersebut kemudian diinkubasi menurut pola Rancangan Acak Lengkap (RAL).

b. Pemanenan Enzim

Enzim dipanen dengan cara disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 4500 rpm pada suhu 4°C kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring agar terpisah dengan residu padatan (Wahyuningtyas *et al.*, 2013).

Uji Aktivitas Enzim Selulase

Penentuan aktivitas enzim selulase dilakukan dengan metode DNS. Sebanyak 1 mL CMC 1% yang dicampur dengan 0,8 mL buffer natrium sitrat (50mM; pH 5), ditambahkan dengan 1 mL ekstrak kasar enzim selulase kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sampel diinkubasi pada suhu 50 °C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan reagen 3,5-dinitrosalicilic acid (DNS) ke dalam tabung reaksi. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Padil, 2016).

Nilai aktivasi selulase ditentukan berdasarkan perhitungan berikut (Kombang, 2004).

$$AE = \frac{C}{BM \text{ glukosa} \times t} \times \frac{H}{E} \quad (1)$$

Keterangan:

- AE : Aktivitas Enzim (Unit/mL)
- C : Konsentrasi glukosa (ppm)
- BM : Berat molekul glukosa (180 gram/mol)
- t : Waktu inkubasi (menit)
- H : Volume total sampel sabut kelapa (mL)
- E : Volume enzim (mL)

HASIL

Persiapan dan Pretreatment Bahan Baku

Sabut kelapa diperoleh dari salah satu tempat tanaman kelapa yang terletak di Kelurahan Naioni, Kecamatan Alak Kota Kupang. Bahan baku yang telah diperoleh sebanyak 4 kg kemudian dibersihkan dari gabusnya dan cuci untuk menghilangkan pengotor yang menempel pada sampel tersebut. Selanjutnya sampel dikeringkan dibawah sinar matahari selama 2-3 hari kemudian digiling.



Gambar 1. Sabut yang telah dikeringkan (kiri) dan sabut yang telah dihaluskan (kanan)

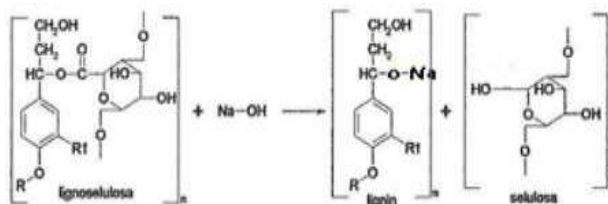
Pretreatment untuk menghilangkan kandungan lignin dilakukan melalui dua cara yaitu penggilingan dan perlakuan kimia basa. Lignin perlu dihilangkan karena senyawa ini mengikat selulosa dan hemiselulosa membentuk polimer kristalin yang sulit diurai dan dihidrolisis. Hasil dari perlakuan penggilingan yaitu serbuk sabut kelapa dengan ukuran yang sama yaitu 100 mesh. Tujuan pengecilan ukuran sampel diduga menyebabkan terputusnya rantai polimer yang panjang menjadi rantai-rantai polimer yang lebih pendek dan meningkatkan daerah amorf sehingga menurunkan derajat kristalinitas. Dengan adanya perlakuan ini dapat menurunkan kristalinitas serta kuat tarik dari selulosa bakteri yang dihasilkan.

Perlakuan kimia basa bertujuan untuk memecah ikatan lignin (*delignifikasi*), mengurangi kandungan lignin, merusak struktur kristalin dari selulosa serta meningkatkanporositas bahan. Rusaknya struktur kristalin selulosa akan mempermudah terurainya selulosa menjadi glukosa. Hasil dari perlakuan kimia basa adalah setelah serbuk sabut kelapa direndam dengan larutan Natrium Hidroksida (NaOH) 6 % selama 12 jam maka terjadi pengurangan sampel dari 3 kg menjadi 2 kg, serta perubahan warna serbuk sabut kelapa dari warna coklatmuda menjadi coklat tua.



Gambar 2. Serbuk sabut kelapa yang direndam dengan NaOH

Terjadinya reaksi pada saat perendaman dengan pelarut NaOH ditunjukkan oleh perubahan warna pada sampel. Ion OH^- dari NaOH akan memutuskan ikatan-ikatan dari struktur dasar lignin sedangkan ion Na^+ akan berikatan dengan lignin membentuk natrium fenolat. Garam fenolat ini bersifat polar sehingga mudah larut dalam pelarut polar. Natrium fenolat ini akan larut dalam NaOH sehingga menyebabkan terjadinya perubahan warna pada sampel.



Gambar 3. Reaksi lignoselulosa dengan NaOH (Susilowati, 2010).

Lignin yang terlarut ditandai dengan warna hitam pada larutan yang disebut lindi hitam (*black liquor*). Lindi hitam tersebut menunjukkan lapisan lignin terpisah dari selulosa. Warna hitam pada larutan juga menandakan bahwa kandungan lignin yang terdapat pada sabut kelapa akan terlepas sehingga didapatkan sampel selulosa yang akan digunakan untuk proses hidrolisis menjadi glukosa.

Persiapan *Trichoderma reesei*

Pertumbuhan jamur *T.reesei* pada media PDA ditunjukkan oleh munculnya bercak berwarna putih kehijauan sepanjang bekas goresan jarum ose pada permukaan media.



Gambar 4. Pertumbuhan jamur *T.reesei* pada media PDA (kiri) dan Pertumbuhan *T.reesei* dalam larutan nutrisi (kanan).

Berdasarkan pengamatan setelah peremajaan selama 7 hari terdapat biakan jamur berwarna putih agak kehijauan yang berbentuk zig zag. Biakan jamur yang tumbuh pada media PDAm merupakan biakan jamur *T.reesei* yang sudah tumbuh dengan baik. Secara makroskopis, morfologi jamur *T.reesei* mengalami perkembangan warna koloni dari hari pertama sampai hari ketujuh. Pertumbuhan spora *T.reesei* pada media cair ditandai dengan adanya warna putih dari miselium yang terapung dipermukaan larutan dan lama kelamaan akan berubah menjadi putih agak kehijauan, hijau muda dan hijau gelap membentuk menyebar seperti tumbuhan lumut.

Produksi Enzim Selulase

Produksi enzim selulase dimulai dengan mencampurkan substrat dengan larutan nutrisi untuk menumbuhkan inokulum *T.reesei* kemudian diinkubasi. Setelah masa inkubasi, enzim selulase dipanen lalu disentrifugasi dan diperoleh ekstrak kasar enzim selulase. Tujuan dilakukan sentrifugasi adalah untuk memisahkan antara padatan (solid) dari sabut kelapa dengan larutan (*supernatant*) pada hasil hidrolisis. Kemudian *supernatant* akan diuji aktivitasnya menggunakan metode DNS.

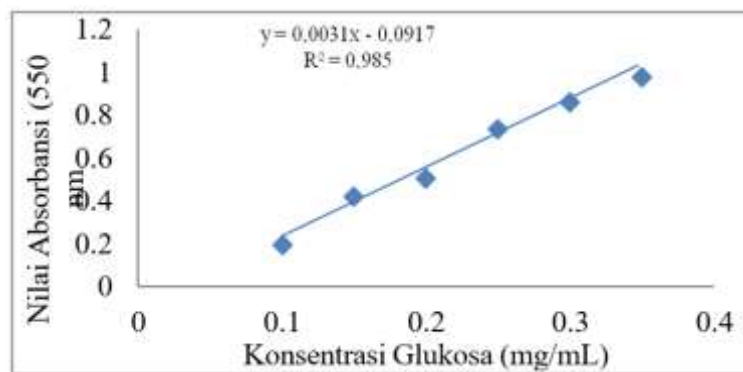


Gambar 5. Larutan ekstrak kasar enzim selulase.

Uji Aktivitas Enzim Selulase

Untuk menentukan aktivitas enzim, terlebih dahulu menentukan konsentrasi glukosa hasil hidrolisis selulosa yang dikatalisis oleh enzim tersebut. Untuk menentukan konsentrasi glukosa dengan metode DNS, diperlukan kurva standar glukosa. Dari kurva standar tersebut, diperoleh persamaan regresi yang nantinya akan digunakan untuk menghitung kadar glukosa hasil hidrolisis. Caranya adalah dengan membuat satu seri larutan glukosa standar yang konsentrasinya ditetapkan lalu setiap larutan tersebut direaksikan dengan larutan DNS. Perubahan warna yang terjadi setelah reaksi diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm. Berdasarkan data yang diperoleh, kemudian dibuat persamaan regresi yang nantinya digunakan untuk menghitung konsentrasi glukosa hasil hidrolisis.

Pada penelitian ini, diperoleh kurva standar yang dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Kurva standar plot konsentrasi terhadap absorbansi 550 nm.

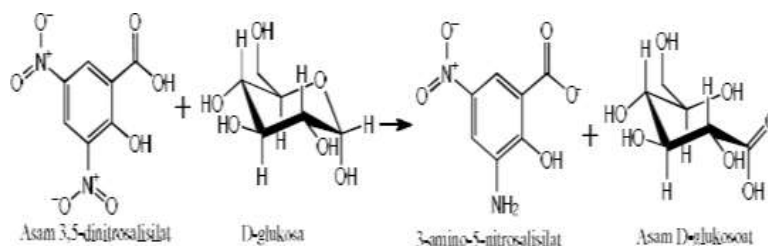
Dari hubungan antara konsentrasi glukosa dengan nilai absorbansinya diperoleh kurva kalibrasi dengan persamaan $y = 0,0031x - 0,0917$ dengan nilai korelasi (R^2) adalah 0,9855. Olehkarena itu, maka dalam penentuan konsentrasi glukosa hasil hidrolisis nanti, konsentrasi glukosa yang dicari dihitung dengan mensubstitusi Y dengan nilai absorbansi yang diperoleh dari pengukuran.

Penentuan kadar glukosa dilakukan terhadap hasil hidrolisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan hasilnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil analisis aktivitas enzim selulase pada sabut kelapa

Waktu (hari)	Aktivitas Enzim (% b/v)			
	10%	15%	20%	25%
3	0,1042	0,1276	0,1522	0,1751
5	0,1231	0,1501	0,1695	0,2048
7	0,1219	0,1481	0,1600	0,1841

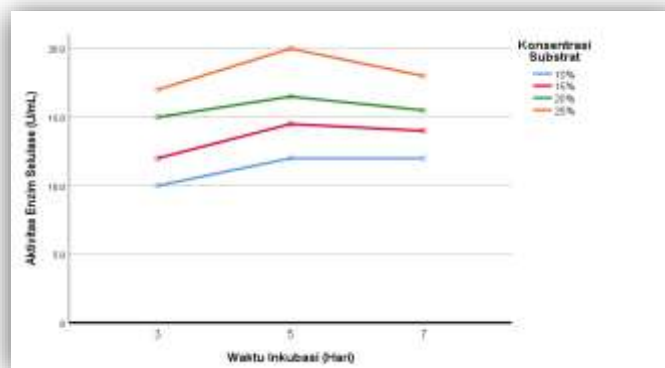
Penentuan aktivitas enzim, terjadi reaksi antara reagen DNS dengan glukosa menghasilkan senyawa asam 3-amino-5-dinitrosalisilat yang berwarna jingga dan dapat diukur serapannya pada $\lambda = 550$ nm. Semakin tinggi konsentrasi senyawa tersebut, semakin pekat warna jingga yang dihasilkan dan semakin tinggi serapannya terhadap cahaya.



Gambar 7. Reaksi DNS dengan Gula Reduksi (Kusmiati *et al.*, 2010).

Berdasarkan persamaan reaksi di atas (Gambar 7), dapat diketahui bahwa semakin tinggi absorbansi yang diperoleh, maka semakin tinggi konsentrasi glukosa di dalam larutan. Tingginya konsentrasi glukosa menunjukkan bahwa aktivitas enzim selulase meningkat dalam menghidrolisis selulosa. Meningkatnya aktivitas enzim selulase sejalan dengan meningkatnya konsentrasi enzim selulase yang diproduksi oleh *T. reesei* pada media sabut kelapa.

Data yang terdapat pada Tabel 2, dalam bentuk grafik dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Grafik hubungan antara konsentrasi substrat dan lama inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase

Berdasarkan Tabel 2 dan Gambar 8 di atas, terlihat bahwa aktivitas enzim selulase tertinggi terdapat pada konsentrasi substrat 25 % dan lama inkubasi pada hari ke-5. Berdasarkan hasil analisis data statistik menggunakan ANOVA dua arah pada penelitian ini dapat diketahui bahwa konsentrasi substrat dan lama inkubasi mempunyai pengaruh terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *T. reesei* pada media sabut kelapa. Namun didapatkan bahwa tidak ada pengaruh interaksi antara kedua variabel bebas tersebut terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan.

Dalam rentang konsentrasi substrat yang digunakan, semakin tinggi konsentrasi substrat maka semakin tinggi aktivitas enzim atau semakin tinggi kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi substrat belum jenuh, artinya bahwa molekul enzim masih tersedia untuk menghidrolisis substrat yang ditambahkan. Pada penelitian ini konsentrasi substrat belum mencapai titik optimum karena konsentrasi substrat paling tinggi adalah 25 %. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Pujiati (2014) tentang pengaruh konsentrasi dan lama inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase dari kapang *Aspergillus niger*. Pada penelitian tersebut menggunakan variasi konsentrasi inokulum 10 %, 15 %, dan 20 %. Nilai aktivitas enzim diperoleh pada konsentrasi inokulum 20 %. Penelitian yang dilakukan oleh Pujiati (2014) juga tentang pengaruh konsentrasi inokulum dan waktu inkubasi terhadap aktivitas crude enzim selulase dari kapang *Trichoderma sp.* Pada penelitian ini menggunakan variasi konsentrasi inokulum 10%, 15 %, dan 20 %. Nilai aktivitas enzim diperoleh pada konsentrasi inokulum 20 %. Semakin besar konsentrasi substrat maka aktivitas enzim selulase yang dihasilkan juga akan semakin besar.

Dari sisi lama inkubasi, waktu yang paling terbaik terdapat ada hari ke-5. Penambahan waktu inkubasi satu hari dan seterusnya menyebabkan aktivitas enzim menurun. Aktivitas enzim selulase ini meningkat dari hari ke-3 sampai hari ke-5, namun mengalami penurunan pada hari ke-7. Pada waktu hari ke-3 aktivitas enzimnya lebih rendah, hal ini disebabkan karena pada waktu hari ke-3 interaksi antara substrat dengan enzim belum maksimal terjadi. Pada waktu hari ke-3 mikroba masih berada pada fase adaptasi, di mana mikroorganisme sudah memasuki proses pertumbuhan tetapi belum optimal. Pada fase ini mikroorganisme masih cenderung memanfaatkan kandungan komponen glukosa dalam substrat lebih dominan daripada komponen selulosa sehingga akan menghambat tersekresinya enzim selulase oleh *T. reesei*. Sedangkan untuk hari ke-5 terlihat aktivitas enzim selulase yang dihasilkan meningkat dan mencapai aktivitas tertinggi. Hal ini disebabkan karena pada hari ke-5 merupakan waktu optimum proses konversi selulosa menjadi glukosa oleh ekstrak kasar enzim selulase yang dihasilkan oleh *T. reesei*. Pada hari ke-5 menunjukkan bahwa *T. reesei* berada pada fase eksponensial. Di mana pada fase ini, mikroba mengalami pertumbuhan yang cepat, dan membutuhkan banyak nutrisi maka dengan sendirinya *T. reesei* menghasilkan enzim selulase untuk mendegradasi selulosa menjadi glukosa agar bisa dimanfaatkan untuk proses metabolismenya. Kemudian pada hari ke-7 aktivitas enzim selulase menurun dikarenakan telah melewati waktu optimum. Pada hari ke-7 mengalami fase stasioner yang menunjukkan bahwa *T. reesei* mengalami keseimbangan antara pertumbuhan dan kematian sel. Hal ini disebabkan ketersediaan nutrisi yang semakin berkurang. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Ariyani (2014) tentang optimasi waktu inkubasi produksi enzim selulase oleh *Aspergillus niger* menggunakan fermentasi substrat padat mendapatkan aktivitas enzim selulase tertinggi pada waktu fermentasi 120 jam (5 hari). Penelitian yang dilakukan oleh Pujiati (2014) tentang pengaruh konsentrasi dan lama inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase dari kapang *Aspergillus niger* juga mendapatkan aktivitas enzim selulase tertinggi pada hari

ke-5. Pada waktu tersebut pertumbuhan mikroba telah mencapai maksimal. Namun pada hari ke-7 aktivitas enzim selulase pada masing-masing konsentrasi mengalami penurunan karena telah melewati waktu optimum. Hal ini mengikuti pola pertumbuhan mikroorganisme yang mengalami beberapa fase pertumbuhan, yaitu fase adaptasi, fase eksponensial, fase stasioner, dan fase kematian (Darwis *et al.*, 1987). Waktu kontak/reaksi antara enzim dan substrat menentukan efektivitas kerja enzim. Semakin lama waktu reaksi maka kerja enzim juga akan semakin optimum. Penurunan aktivitas enzim menunjukkan bahwa terjadi perubahan konformasi enzim dengan substrat sehingga ikatan antara keduanya semakin melemah (Lehninger, 2010).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan di atas dapat disimpulkan bahwa lama inkubasi dan konsentrasi substrat pada sabut kelapa berpengaruh terhadap aktivitas enzim selulase yang mengindikasikan produksi enzim selulase oleh *Trichoderma reesei*. Lama inkubasi yang paling terbaik dalam penelitian ini adalah 5 hari, sedangkan konsentrasi substrat terbaik belum tercapai.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Ahmed, A. P. Vermette (2008), "Culture-based Strategies to Enhance Cellulase Enzyme Production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in Bioreactor Culture Conditions", *Biochemical Engineering Journal*, 40: 399–407.
- [2] Ariyani, S. B., Asmawit, & Utomo, P. P (2014, Desember). Optimasi Waktu Inkubasi Produksi Enzim Selulase Oleh *Aspergillus niger* Menggunakan Fermentasi Substrat Padat. *Biopropal Industri*, 5(2):61-67.
- [3] Gautam, S. P., Bundela, P. S., Pandey, A. K., Khan, J., Awasthi, M. K., & Sarsaiya, S. (2011). Optimization for the Production of Cellulase Enzyme from Municipal Solid Waste Residue by Two Novel Cellulolytic Fungi. *Biotechnology Research International*, 1: 1–8.
- [4] Gologuri BR, Thulluria C, Addepally U, Shetty PR. (2015). Novel alkali-thermostable xylanase from *Thielaviopsis basicola* (MTCC1467): Purification and kinetic characterization. *Intl J Biological Macromolecules*, 82: 823–829.
- [5] Kodri, Argo, B. D., & Yulianingsih, R. (2013). Pemanfaatan Enzim Selulase dari *Trichoderma Reesei* dan *Aspergillus Niger* sebagai Katalisator Hidrolisis Enzimatis Jerami Padi dengan Pretreatment Microwave. *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*, 1(1):36–43.
- [6] Kombang, H. (2004). Evaluasi Daya Hidrolitik Enzim Glukoamilase dari Filtrat Kultur *Aspergillus niger*. *Jurnal Ilmu Dasar*, Vol 5:16-20.
- [7] Kusmiati, dan Agustini, N. (2010). Pemanfaatan Limbah Onggok untuk Produksi Asam Sitrat dengan Penambahan Mineral Fe dan Mg pada Substrat Menggunakan Kapang *Trichoderma sp.* dan *Aspergillus niger*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- [8] Lehninger, A. (2010). Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1. Jakarta: Erlangga.
- [9] Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (1988). *Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publisher.
- [10] Lynd, L. R., Weimer, P. J., Zyl, willem H. Van, & Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization. *Fundamentals and Biotechnology*, 66(3):506–577.
- [11] Martins, L.F., D. Kolling, M. Camassola, A.J.P. Dillon, L.P. Ramos (2008), "Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* Cellulases in Relation to Their Activity Against Various Cellulosic Substrates", *Bioresource Technology*, 99:1417–1424.
- [12] Melati, I., Mulyasari, M., Sunarno, M. T. D., Bintang, M., & Kurniasih, T. (2014). Produksi Enzim Selulase Dari Bakteri Ts2b yang Diisolasi dari Rumpun Laut dan Pemanfaatannya dalam Menghidrolisis Kulit Ubi Kayu dan Daun Ubi Kayu sebagai Bahan Baku Pakan Ikan. *Jurnal Riset Akuakultur*, 9(2):263.
- [13] Meryandini A., Widosari W., Maranatha B., Sunarti TC., Rachmania N., and Satria H. (2009). Isolasi bakteri selulolitik dan karakterisasi enzimnya. *Jurnal Sains*, 13(1):33–38.
- [14] Padil, S.S., Hidayat, M.H., & Rina Sri Kasiandari. (2016). Kinerja Enzim Ganda Pada Pretreatment Mikroalga Untuk Produksi Bioetanol. <https://doi.org/10.15294/jbat.v4i2.7564>
- [15] Pujiati. Kiswardianta, R.B., dan Solikati, W. (2014). Pengaruh Konsentrasi dan Lama Inkubasi terhadap Aktivitas Enzim Selulase dari Kapang *Aspergillus niger*. *Jurnal LPPM*, 2(1):19-24.

- [16] Pujiati, Kiswardianta, R.B., dan Wahyuni, S. (2014). Pengaruh Konsentrasi Inokulum dan Waktu Inkubasi terhadap Crude Enzim Selulase dari Kapang *Trichoderma sp.* *Prosiding Seminar Nasional Biologi*. ISBN: 978-602-0951-0304
- [17] Sitompul, L.L. (2017). Produksi Gula Reduksi dari Sabut Kelapa dengan Menggunakan Kombinasi Enzim Selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* Terimobilisasi pada Chitosan Magnetic Microparticle, *Skripsi*, Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh November Surabaya.
- [18] Sjostrom, S. (1981). Interactions and Constitutive Models for Calculating Quench Stresses calculating quench stresses in steel. *Materials Science and Technology*, 1(1):823-829.
- [19] Suhartono, M.T. (1989). *Enzim dan Bioteknologi*. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.
- [20] Susilowati. 2010. Pemanfaatan Tongkol Jagung Sebagai Bahan Baku Bioetanol Dengan Proses H₂SO₄ Dan Fermentasi *Saccharomyces Cereviceae*. *Jurnal Distilasi* 45(56): 456-465.
- [21] Wahyuningtyas, P., Argo, B. D., & Nugroho, W. A. (2013). Studi Pembuatan Enzim Selulase Dari Mikrofungi *Trichoderma reesei* Dengan Substrat Jerami Padi Sebagai Katalis Hidrolisis Enzimatik Pada Produksi Bioetanol. *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*, 1(1):21-25.
- [22] Widiyanti, R.A. (2015). Pemanfaatan Kelapa menjadi VCO (Virgin Coconut Oil) sebagai Antibiotik Kesehatan dalam Upaya Mendukung Visi Indonesia Sehat 2015. In *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi*. Universitas Muhammadiyah Malang. Vol 21:577-584.
- [23] Wiratmaja, I.G., Kusuma, I.G.B.W., dan Winaya, I.N.S. 2011. Pembuatan Etanol Generasi Kedua Dengan Memanfaatkan Limbah Rumput Laut *Eucheuma Cottonii* Sebagai BahanBaku. *Jurnal Energi dan Manufaktur*, 5(1). <https://ojs.unud.ac.id/index.php/jem/article/view/2353>.